



Cristalografia: 100 Anos no Caminho da Inovação

Leonardo R. Almeida, Jhonata J. Silva, Vitor S. Duarte,
Thalita N. S. dos Santos & Hamilton B. Napolitano.

A cristalografia é uma metodologia científica de excelência interdisciplinar, que surgiu como uma das mais promissoras inovações dos últimos 100 anos, considerando sua ampla aplicação e importância do ponto de vista tecnológico e de propriedade intelectual envolvida—que permite conhecer a estrutura de um composto químico, desde que esteja no estado sólido cristalino sem nenhuma informação *a priori*. O conhecimento do arranjo tridimensional molecular é uma das principais e mais importantes informações para as ciências moleculares. A metodologia cristalográfica é baseada em fundamentos como difração de raios X por sólidos cristalinos, simetria, Lei de Bragg e a transformada de Fourier.

Palavras-chave: *Cristalografia; Difração de raios X; Lei de Bragg.*

Crystallography is a scientific methodology of interdisciplinary excellence, which has emerged as one of the most promising innovations of the last 100 years, considering its wide application and importance, from a technological point of view and intellectual property involved, which allows to know the structure of a chemical compound, since it is in the crystalline solid state without any *a priori* information. Knowledge of the three-dimensional molecular arrangement is one of the main and most important information for molecular sciences. The crystallographic methodology is based on fundamentals such as X-ray diffraction for crystalline solids, symmetry, Bragg's Law and the Fourier transform.

Keywords: *Crystallography; X-ray diffraction; Bragg's Law.*



Introdução

Após 100 anos de desenvolvimento, a cristalografia de raios X consolidou-se como uma metodologia de referência para estudar a estrutura atômica, as propriedades dos materiais e atualmente encontra-se no centro de vários domínios científicos. O ano de 2014 foi declarado pela UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) o “Ano Internacional da Cristalografia” em comemoração ao centenário de seu nascimento, homenageando os trabalhos pioneiros de Max Von Laue, Wiliam Henry Bragg e William Lawrence Bragg¹.

A cristalografia é uma metodologia científica extremamente importante para diferentes áreas da ciência, sendo que são 30 prêmios Nobel até o momento, envolvendo a metodologia. Alguns laureados destacam-se como Wilhelm Conrad Röntgen que, em 1901, ganhou o primeiro Prêmio Nobel de Física pela descoberta dos raios X; em 1914, M. von Laue e seus colaboradores pela descoberta da difração de raios X e estudo da detecção da interferência das ondas difratadas, comprovando o caráter ondulatório da radiação de raios X e a periodicidade do estado cristalino; em 1913, W. H. Bragg e W. L. Bragg pela dedução da equação conhecida como Lei de Bragg, que fornece informações sobre o retículo cristalino a partir do fenômeno da difração; em 1964, Dorothy Crowfoot Hodgkin ganhou o Prêmio Nobel de Química pela revelação da estrutura de um grande número de moléculas biológicas, incluindo o colesterol, a penicilina e a insulina; em 1962, John Cowdery Kendrew e Max Ferdinand Perutz elucidaram a estrutura cristalina de uma proteína, o que lhes concedeu o Prêmio Nobel de Química^{2,3,4}.

Atualmente, mais de 90.000 proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas biológicas foram determinadas, baseando-se na cristalografia de raios X. No século XX, James Dewey Watson, Francis Harry Compton Crick e Maurice Hugh Frederick Wilkins elucidaram a estrutura cristalina do DNA, a partir das experiências de difração realizadas por Rosalind Elsie Franklin. A descoberta da dupla-hélice abriu caminho para a cristalografia das proteínas e das macromoléculas, fundamental para a Biologia e para a Medicina atual. Nos últimos 50 anos, a cristalografia e os métodos cristalográficos continuaram o

seu processo evolutivo, recentes trabalhos na área foram laureados com Prêmio Nobel, como pela identificação da estrutura de um ribossomo e a forma como é interrompido por antibióticos (2009), pela descoberta do funcionamento interno de uma importante família de receptores celulares, que comandam grande parte das funções do corpo humano (2012)¹.

O conhecimento da estrutura molecular e cristalina de um composto é importante para o entendimento das propriedades físico-químicas e estudos de aplicação. Entretanto, poucas são as metodologias disponíveis quando se faz necessário saber a distribuição espacial relativa dos átomos constituintes de uma dada molécula. Estas metodologias incluem: Difração de Raios X por Monocristais, Difração de Nêutrons, Ressonância Magnética Nuclear, Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo, Microscopia Eletrônica, Modelagem Teórica e outros. Sendo que a metodologia cristalográfica apresenta-se como a mais adequada devido à alta resolução com que pode descrever a densidade eletrônica⁵.

A cristalografia é um ramo da ciência que estuda a estrutura da matéria em nível atômico, com a classificação e interpretação geométrica da estrutura dos cristais. É compreendida de forma interdisciplinar nas áreas da física, química, biologia molecular, ciências dos materiais e mineralogia². Em Física e na Ciência dos Materiais, é indispensável na relação entre as propriedades físicas e a estrutura interna dos sólidos. Na Química, os parâmetros estéricos de novos compostos ou complexos são obtidos, devido à caracterização de sua estrutura. Na Biologia e Bioquímica, a potencialidade de uma molécula está vinculada com a sua estrutura tridimensional. Em Medicina e Farmacologia, a atividade de alguns fármacos está relacionada com as interações entre o fármaco e receptor, a explicação desta ação é resultante do conhecimento estrutural de ambos⁶.

A metodologia cristalográfica é baseada no fenômeno da difração, e fornece o conhecimento da disposição tridimensional dos átomos na estrutura molecular para compostos no estado cristalino, quando expostos à radiação, não necessitando de nenhum conhecimento *a priori*⁷. Como resultado do experimento da difração de raios X, obtêm-se as intensidades e as posições dos feixes difratados, a partir dos quais pode se obter a amplitude dos



fatores de estrutura. Toda informação explícita das fases dos fatores de estrutura é perdida durante o experimento, o que impossibilita a determinação analítica da estrutura, a partir das intensidades medidas. Assim, as posições atômicas são determinadas pelos valores máximos da função de densidade eletrônica, e para que essa função seja conhecida, torna-se necessário o conhecimento dos fatores de estrutura (amplitude e fase) de cada reflexão coletada^{5,6}.

A partir do conhecimento tridimensional dos átomos e das posições atômicas individuais, podem-se calcular as distâncias interatômicas, ângulos de ligação e avaliar informações sobre empacotamento molecular e distribuição de carga molecular. Tais informações são de grande interesse para os químicos, bioquímicos e biólogos moleculares que estão interessados na relação de características estruturais de efeitos químicos e biológicos, e expandem a compreensão da estrutura eletrônica, tensão molecular, e as interações entre as moléculas^{8,9}.

Difração de Raios X

As ondas eletromagnéticas apresentam o comportamento característico de sofrerem interferência entre si, essa interferência propicia maiores deslocamentos nos pontos em que os máximos ou os mínimos coincidem, e menores deslocamentos quando máximos coincidem com os mínimos. De acordo com a teoria eletromagnética clássica, a intensidade da radiação eletromagnética é proporcional ao quadrado da amplitude das ondas. Portanto, as regiões de interferência construtiva ou destrutiva exibem, alternadamente, intensidades reforçadas ou intensidades diminuídas¹⁰.

Os raios X são radiações de natureza eletromagnéticas, com comprimento de onda muito pequeno em comparação ao da luz visível, foram descobertos em 1895 pelo físico alemão W. Röntgen e ocupam no espectro eletromagnético a região entre os raios gama e ultravioleta, tendo comprimento de onda que varia de 0,1 a 100 Å⁹. Experimentalmente, os raios X usados têm intervalo de comprimento de onda, variando de 0,4 a 2,5 Å. Os raios X geralmente são produzidos quando um feixe de elétrons acelerados por um campo elétrico colide com um alvo metálico, provocando rápida desaceleração desse feixe de elétrons.

Do ponto de vista da teoria quântica, os raios X podem ser compreendidos como um feixe de fótons com energia $h\nu$. Pela alta frequência desta radiação, pode-se perceber a evidência de que possuem alta energia, conforme Equação (1) seu comprimento de onda depende da energia,

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Eq. (1)}$$

em que h é a constante de Planck, c é a constante da velocidade da luz, ν é a frequência e λ é o comprimento de onda da radiação⁸.

Quando um feixe de raios X atinge algum material cristalino, os elétrons de seus átomos são forçados a oscilar, devido ao campo elétrico que compõe a radiação incidente, tornando, segundo a teoria clássica da radiação eletromagnética, uma nova fonte espalhadora em todas as direções. O fenômeno da difração surge da interferência destas ondas espalhadas pelos diversos espalhadores discretos que, quando arranjados ordenadamente, ou seja, apresentam simetria translacional, possibilitam a obtenção da informação estrutural da molécula. A difração pode ser explicada pelo princípio de Huygens que, qualitativamente, diz que “todos os pontos de uma frente de onda de luz podem ser considerados fontes puntiformes que produzem ondas secundárias”^{7,8}.

O fenômeno da difração é a interferência provocada por um corpo colocado na trajetória das ondas, e a distribuição espacial da intensidade resultante dessa interferência é chamada de Figura de difração. A difração ocorre quando as dimensões do corpo que provoca a difração são comparáveis ao comprimento de onda da radiação¹⁰. O arranjo atômico dentro de um cristal só pôde ser elucidado experimentalmente, a partir do início do século XX, com o desenvolvimento da primeira técnica, a difração de raios X pelos cristais que foi descoberta em 1911 pelo físico alemão Max Von Laue.

O método original de Von Laue consistia em passar um feixe de raios X de ampla faixa de comprimento

de onda através de um monocristal e registrar a Figura de difração (Imagem do Padrão de difração Figura 1) fotograficamente. A ideia era de que um cristal poderia não estar adequadamente orientado para atuar como uma rede de difração para um único comprimento de onda, mas independentemente de sua orientação, a difração poderia ser alcançada, pelo menos, para um dos comprimentos de onda, se um amplo intervalo fosse usado. Atualmente, há um interesse renomado nesta abordagem, com o uso da radiação disponível, a partir de fontes de síncrotron, que cobre uma faixa contínua de comprimento de onda de raios X e sua alta intensidade reforça a sensibilidade da técnica¹⁰.

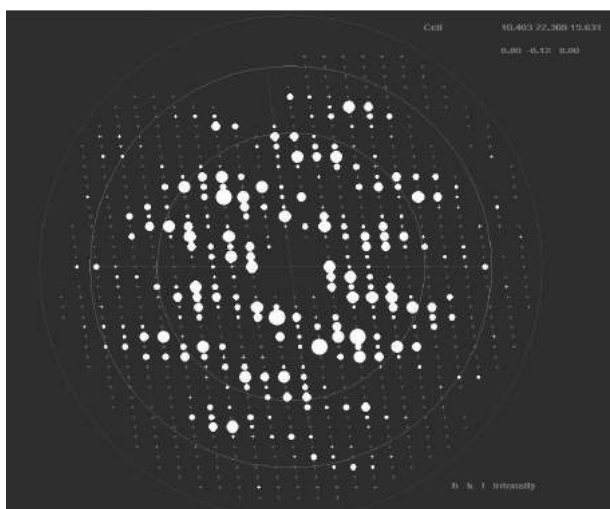


Figura 1. Parte de um padrão de difração de raios X gerado por uma pequena molécula.

Quase todo o trabalho moderno de cristalografia de raios X é baseado no método desenvolvido por Willian Henry Bragg e seu filho Willian Lawrence Bragg. Eles usaram um monocristal e um feixe monocromático de raios X e giraram o cristal até que uma reflexão fosse detectada.

A dedução da fórmula fundamental por W. L. Bragg para análise estrutural da matéria ocorreu em 1912, sendo uma forma analítica de extrair informações do fenômeno da difração. A partir de sua descrição e da intensidade associada a cada direção difratada, podemos obter diversas informações sobre

a estrutura da matéria, tais como: (1) conhecimento do tipo de retículo cristalino associado ao ordenamento dos átomos; (2) estrutura molecular; (3) simetria envolvida no empacotamento; (4) estrutura cristalina, entre outros. A utilidade prática desta teoria pode ser avaliada pela quantidade de estruturas moleculares resolvidas, atingindo a ordem de centenas de milhares, disponíveis, por exemplo, nos bancos de dados do Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), para estruturas de moléculas pequenas, e do Protein Data Bank (PDB), para estruturas de macromoléculas.

Lei de Bragg

Com a descoberta da difração de raios X em cristais por Von Laue, mostrou-se que este fenômeno poderia ser descrito em termos de difração de uma grade tridimensional. Por outro lado, W. L. Bragg, em 1913, mostrou que a distribuição angular da radiação espalhada pode ser compreendida, considerando que os raios difratados comportam-se como se fossem refletidos, a partir de planos, passando através de pontos da rede cristalina. Essa reflexão é semelhante ao espelho, no qual o ângulo incidente da radiação é igual ao ângulo de reflexão⁹. Considerando um feixe de raios X incidente num par de planos paralelos com distância interplanar d (Figura 2).

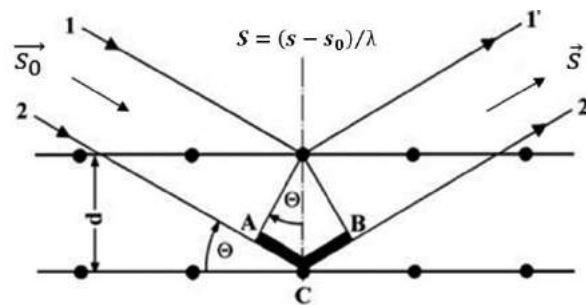


Figura 2. Representação esquemática (fora de escala) da equação de Bragg. θ é o ângulo entre o feixe de raios X incidente e o plano difrator hkl . A diferença de caminho entre as duas ondas espalhadas por A e C é $AC + CB = 2dhklsen\theta$. A condição de difração é verificada quando a diferença de caminho for um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ . O módulo do vetor $Shkl$ é o inverso da distância interplanar $dhkl$.



Os raios paralelos incidentes 1 e 2 formam um ângulo θ com esses planos. Supondo que os elétrons em A e C sejam forçados a vibrar por oscilação do raio incidente e, como cargas vibratórias, irradiarão em todas as direções. Especificamente, para a direção onde raios paralelos secundários 1' e 2' emergem no ângulo θ como se fossem refletidos pelos planos, uma intensidade máxima do feixe difratado resultará, se as ondas representadas por estes raios estiverem em fase. A diferença entre o caminho ótico das duas ondas espalhadas pelo conteúdo eletrônico de A e C é dado pela Equação (2):

$$\delta = \overline{AC} + \overline{BC} = r \cdot (s - s_0) \quad \text{Eq. (2)}$$

Sabendo que a radiação usada na maioria dos experimentos de difração é monocromática com um único comprimento de onda λ , a diferença de fase entre as duas ondas será dada conforme Equação (3):

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta = 2\pi r \cdot \frac{(s - s_0)}{\lambda} = 2\pi r \cdot s \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que $r \cdot s$ deve ser um número inteiro, pois a diferença de fase é igual a $n\lambda$. Tomando as perpendiculares de A e C, respectivamente, fica claro que os ângulos $AC = BC = \theta$. Neste caso, $AC = BC$, e se $AC + BC$ (igual a $2AC$) é um número inteiro de comprimento de onda (λ), então, as ondas no raio 2' estarão em fase com as ondas do raio 1'. Como $AC/d \equiv \sin \theta$ e n um número inteiro, teremos a expressão descrita na Equação (4), conhecida como lei de Bragg. Nesta equação, d corresponde à distância interplanar, θ ao ângulo de incidência, λ ao comprimento de onda do feixe incidente e n é a ordem da difração.

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{Eq. (4)}$$

Neste caso, consideraram-se somente as reflexões de dois planos, portanto, os máximos de difração são pouco

definidos e observados com uma variação relativamente grande em relação ao valor de θ , que satisfaz a lei de Bragg. Em cristais, porém, muitos planos compõem um mosaico de blocos que constituem o cristal macroscópico. Sob essas condições, o máximo de difração será bem definido somente para valores de θ que estejam muito próximos do valor que satisfaz a lei de Bragg. Como a densidade eletrônica na cela unitária de um cristal não está distribuída em planos, mas sim tridimensionalmente por toda a cela, a lei de Bragg não retrata a realidade dentro do cristal. Porém, não se pode deixar de lado sua importância para o desenvolvimento da ideia de espaço recíproco e para a elucidação da difração de raios X¹¹.

A Densidade Eletrônica e o Problema da Fase

Existem muitos fatores que afetam a intensidade dos raios X no padrão de difração. Um deles depende apenas da estrutura cristalina, é chamado fator de estrutura. Trata-se do efeito do espalhamento de ondas nas direções hkl , devido a N átomos na cela unitária. Cada onda que contribui para esta resultante possui amplitude proporcional a f_j (fator de espalhamento atômico) e a fase $[2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)]$. Expressa a soma do poder de espalhamento de todos os átomos da cela unitária, em relação a um plano hkl . Está relacionada, portanto, à distribuição dos átomos na cela unitária e a partir do conhecimento da sua distribuição eletrônica¹¹. Pode ser expressa de forma genérica para uma única cela unitária, conforme Equação (5):

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad \text{(Eq. 5)}$$

A Equação (5) é conhecida como equação do Fator de Estrutura $F(hkl)$, que é uma medida da amplitude de reflexão para um conjunto de planos hkl . O fator de estrutura é um número complexo que representa o espalhamento de raios X por todos os componentes da cela unitária. Os fatores de estrutura dependem somente



da estrutura cristalina e dão uma descrição matemática do padrão de difração. Se as posições de todos os átomos na cela unitária são conhecidas, então, o correspondente padrão de difração pode ser calculado¹¹.

A estrutura cristalina $r(\mathbf{r})$ e o padrão de difração $F(\mathbf{h})$ estão relacionados entre si pelo procedimento matemático da transformada de Fourier. Este teorema de grande utilidade e importância, desenvolvido por Baron Jean Baptiste Fourier (1768 - 1830), estabelece que qualquer função de uma variável contínua de um valor simples pode ser expandida como uma série de harmônicos (senos ou cossenos). A transformada de Fourier de uma função periódica é a soma das transformadas de Fourier de suas componentes individuais, obtidas pela sua série de Fourier^{11,12}.

O padrão de difração de um cristal é a análise de Fourier da estrutura cristalina, correspondendo ao padrão das ondas espalhadas por um feixe de raios X incidente em uma amostra cristalina. Por sua vez, a estrutura cristalina é a síntese de Fourier do padrão de difração e é expresso em termos da distribuição de densidade eletrônica concentrada em átomos¹¹. Essa não é possível ser medida por nenhum método direto, devido a limitações conceituais, fundamentadas na incompatibilidade do olho humano em enxergar no comprimento de onda da grandeza atômica da matéria, não seria possível desenvolver, por exemplo, um microscópio ótico com tal resolução, também não pode ser obtido diretamente por cálculos porque as fases relativas das ondas são desconhecidas. Porém, o padrão de difração pode ser medido pelo experimento de difração de raios X. Durante o experimento, são obtidas as amplitudes por medidas diretas das intensidades, considerando um número de correções. Entretanto, as fases relativas das ondas espalhadas são perdidas¹¹. O fator estrutura e a função de densidade eletrônica estão relacionados pela Equação (6):

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad \text{Eq. (6)}$$

É possível utilizar outra forma de descrição mais compacta em que $hx+ky+lz$ são dados por $\mathbf{h.r}$. E com esta

informação, pode-se reescrever a Equação (6) e obter a Equação (7):

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})| \exp[-2\pi i(\mathbf{h.r}) + i\phi(\mathbf{h})] \quad \text{Eq. (7)}$$

Na equação da densidade eletrônica Eq. (7), V é o volume da cela unitária e $F(\mathbf{h})$ é o fator de estrutura na forma complexa, sendo seu módulo $|F(\mathbf{h})|$ proporcional à intensidade da reflexão medida para direção hkl . A quantidade $\mathbf{h.r}$ corresponde ao produto escalar entre o vetor espalhamento no espaço recíproco \mathbf{h} e o vetor posição no espaço direto \mathbf{r} . O problema da fase fica evidente na Equação (7), uma vez que o conhecimento da função $\rho(\mathbf{r})$ para cada posição \mathbf{r} da cela unitária depende do conhecimento das fases $\phi(\mathbf{h})$ que são perdidas no processo de medida. De uma forma geral, a solução do problema da fase em cristalografia de pequenas moléculas é obtida por Métodos Diretos ou Método de Patterson⁷. Assim, se os fatores de estrutura, $F(\mathbf{h})$, são conhecidos para todas as reflexões hkl , então, a densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ pode ser calculada para cada ponto xyz , na cela unitária. O que permite a construção de um mapa de densidade eletrônica tridimensional (3D), tal como apresentado na Figura 3.

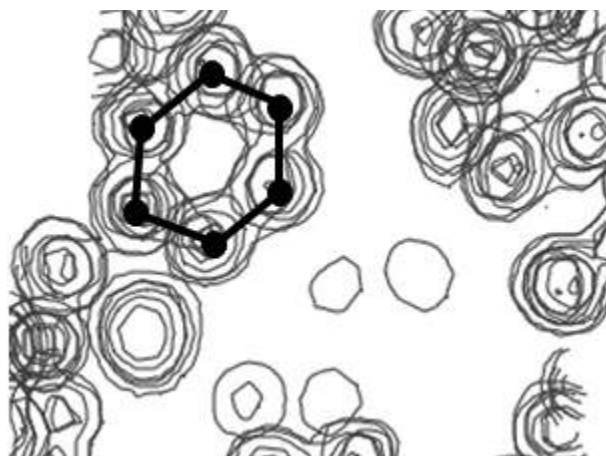


Figura 3. Esquema de representação da construção de um mapa de densidade eletrônica em 3 Dimensões com resolução compatível para a identificação de um provável anel aromático (conforme destacado).



Coleta de Dados e Solução da Estrutura

Os dados obtidos, por meio de experimentos de difração de raios X, consistem nas intensidades e nas posições dos feixes difratados, a partir dos quais se pode obter a amplitude dos fatores de estrutura $|F(\mathbf{h})|$. Toda informação explícita das fases dos fatores de estrutura, $\varphi(\mathbf{h})$, é perdida durante o experimento, o que impossibilita a determinação analítica da estrutura, a partir das intensidades medidas. As posições atômicas são determinadas pelos valores máximos da função de densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ Equação (8)^{7,11}, em que V é o volume da cela unitária e $F(\mathbf{h})$ é o fator de estrutura na forma complexa, sendo seu módulo $|F(\mathbf{h})|$ proporcional à intensidade da reflexão medida para direção hkl . A quantidade $\mathbf{h}\cdot\mathbf{r}$ corresponde ao produto escalar entre o vetor espalhamento no espaço recíproco \mathbf{h} e o vetor posição no espaço direto \mathbf{r} ⁷.

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F(\mathbf{h}) \exp[-2\pi i(\mathbf{h}\cdot\mathbf{r})] = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})| \exp[-2\pi i(\mathbf{h}\cdot\mathbf{r}) + i\varphi(\mathbf{h})] \quad \text{Eq. (8)}$$

O problema da fase fica evidente, por meio da Equação (8), uma vez que o conhecimento da função $\rho(\mathbf{r})$ para cada posição \mathbf{r} da cela unitária depende do conhecimento das fases $\varphi(\mathbf{h})$. Com o objetivo da obtenção da fase, concentra-se a etapa de solução da estrutura. Sua solução para a cristalografia de pequenas moléculas, em geral, é obtida por meio dos Métodos Direto e/ou do Método de Patterson^{2,15}. As posições atômicas são correspondentes aos pontos de máximo da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$. Os programas mais comumente utilizados na resolução da estrutura são SHELXS¹⁶, SIR¹⁷ e/ou DIRDIF¹⁸.

Métodos Diretos

Quando medimos o padrão de difração, isso nos dá apenas as intensidades (que podem ser transformadas em amplitudes), mas não as fases dos fatores de estrutura. As fases $\varphi(\mathbf{h})$ são mais importantes para a determinação da função densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$, em relação às amplitudes. O termo Métodos Diretos é aplicado à

metodologia desenvolvida por Jerome Karle e Herbert Aaron Hauptman (laureados com o Prêmio Nobel de Química em 1985 pelo trabalho sobre a resolução do problema de fase para estruturas de pequenas moléculas) cujo objetivo é encontrar as fases dos fatores de estrutura $F(\mathbf{h})$, por meio de relações matemáticas, diretamente, a partir de um conjunto de intensidades medidas experimentalmente. É um método amplamente utilizado na solução do problema da fase para pequenas moléculas^{11,13}. Em geral, a fase e a amplitude de uma onda são quantidades independentes, mas felizmente, no caso da difração de raios X, as amplitudes dos fatores de estrutura $|F(\mathbf{h})|$ e as fases $\varphi(\mathbf{h})$ estão relacionadas por meio do conhecimento da função densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$, conforme a Equação (7)^{11,12}. Desta forma, se as fases são conhecidas, as amplitudes podem ser calculadas, conforme a informação da densidade eletrônica, e similarmente, as fases podem ser calculadas a partir das amplitudes.

Desde que $\rho(\mathbf{r})$ está relacionado com o fator estrutura por um procedimento matemático (Transformada de Fourier), restrições na densidade eletrônica impõem restrições matemáticas correspondentes no fator estrutura. Como a amplitude é conhecida, a maioria das restrições limita os valores das fases dos fatores de estrutura e, em casos favoráveis, são suficientes para atribuir os valores da fase diretamente. A fim de entender como é possível relacionar estas duas grandezas, uma importante propriedade física da função de densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ deve ser considerada: atomicidade [$\rho(\mathbf{r})$ é composta por átomos discretos]^{7,11}.

Para a elaboração do mapa de densidade, os métodos de solução devem atender a alguns critérios impostos para função densidade, tal como:

- A densidade é sempre positiva;
- É construída de átomos discretos.

Para fazer uso da propriedade da atomicidade da função de densidade eletrônica, é necessário remover o efeito da forma do átomo do fator de estrutura $F(\mathbf{h})$ e convertê-lo para fatores de estrutura normalizados $E(\mathbf{h})$. A necessidade do fator de estrutura normalizado vem do fato que, no início da resolução de estruturas, somente as posições atômicas interessam e não o detalhe da forma de distribuição da densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ ^{9,11}. Logo, os



Métodos Diretos são aqueles que buscam derivar as fases, por meios dos fatores de estruturas coletados diretamente de um único conjunto de intensidades¹².

No início de uma resolução estrutural, algumas fases são arbitradas, dentro de certos critérios, e as outras são obtidas por um processo decorrente das relações entre as fases. Posteriormente, essas fases são refinadas por um processo interativo, culminando para as fases corretas. Com as informações de intensidades e fases, a densidade eletrônica pode ser calculada e a estrutura resolvida. Quando este problema da fase é considerado quase solucionado, por alguma aproximação, imagina-se que o mapa de densidade eletrônica mostrará a posição exata dos átomos na cela unitária¹¹. Isto não é verdade, pois seria necessário estender a série de Fourier ao infinito, relação que se torna impossível¹⁴. Logo, qualquer mapa de densidade eletrônica apresenta um erro. A fim de aperfeiçoar este mapa, utiliza-se o refinamento dos parâmetros estruturais.

O melhor conjunto de fases, como indicados pelas figuras de mérito, serão usadas para cálculo dos mapas de densidade eletrônica (Figura 3). Frequentemente, o melhor mapa, de acordo com as figuras de mérito, revelam muitas das posições atômicas.

Refinamento

O refinamento é o procedimento de minimização da discordância entre os módulos dos fatores de estrutura observados $|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}$ e calculados $|F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}$, que realiza pequenas modificações nos parâmetros atômicos determinados para a estrutura aproximada. Átomos podem ainda ser acrescentados, por meio da síntese de Fourier^{2,15}, e ter também seus parâmetros refinados. O princípio utilizado é o dos Mínimos Quadrados^{2,15} em que a soma dos erros ao quadrado é minimizada por meio da função M dada pela Equação (9):

$$M = \sum_{\mathbf{h}} w_{\mathbf{h}} \left[|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}^2 - |F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}^2 \right]^2 \quad \text{Eq. (9)}$$

em que w é peso atribuído à cada reflexão, inversamente

proporcional ao *desvio padrão* que está associado à medida da reflexão h . O refinamento é um processo interativo na construção do modelo cristalográfico, guiado pela convergência e pela consistência química do modelo obtido. Em geral, os programas utilizados são o SHELXL¹⁹ e/ou SIR¹⁷.

Esperava-se que, com a evolução da informática e dos equipamentos de coleta de dados, fossem criadas estratégias automatizadas de refinamento de estruturas, mas um número crescente de estruturas tem requerido a intervenção e a percepção humana. Se o refinamento de uma estrutura não converge de um jeito normal, algumas possíveis ações podem ser executadas. Problemas durante o refinamento aparecem quando os fatores R crescem incontrolavelmente, ou mudanças de parâmetros fazem a estrutura irreconhecível. Exclusão de átomos válidos é geralmente menos prejudicial do que a inclusão de falsos e, em qualquer caso, os átomos válidos reaparecem em mapas posteriores¹¹.

Após a finalização do trabalho de construção do modelo estrutural, todas as informações cristalográficas podem ser armazenadas em um arquivo-texto (formato txt*) comum, respeitando o padrão *Crystallographic Information File* (CIF)²⁰, adotado em 1991 pela *International Union of Crystallography* (IUCr). Nesta etapa, o autor do trabalho será reconhecido como detentor da propriedade intelectual da estrutura trabalhada. Uma vez construído o modelo estrutural cristalográfico e tendo-se todas as informações no formato CIF, a etapa seguinte é a validação.

Validação da Estrutura Cristalina

A análise de possíveis erros referentes ao modelo construído é feita durante a etapa de validação que irá avaliar a exatidão e a precisão desses resultados, sendo de grande importância para a qualidade e confiabilidade das estruturas resolvidas. Os critérios analisados são: a coerência química na estrutura, o conjunto dos dados, a precisão nas distâncias e ângulos de ligação, a qualidade dos índices estatísticos, a vibração térmica dos átomos, as interações intermoleculares, a desordem no cristal e a completude do espaço tridimensional cristalino. Índices estatísticos são utilizados para avaliar a diferença entre



o conjunto de dados teóricos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}$, gerado para o modelo construído, e o conjunto de dados experimentais $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}$, medido a partir do cristal que contém o erro randômico^{7,21}.

Uma avaliação estatística, fazendo uso dos conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}$ e $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}$, pode ser feita com Figuras de Mérito, índices estatísticos, que indicam a qualidade de uma estrutura cristalográfica, sempre obtidos pela comparação entre os fatores de estrutura medidos experimentalmente e aqueles calculados teoricamente. O grau com que a distribuição das diferenças entre os conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}$ e $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}$ se ajusta aos valores esperados, afetados pelos erros randômicos, pode ser avaliado através do teste do χ^2 (chi-quadrado)^{2,7}, dado pela expressão do Goodness of Fit (Goof) ou simplesmente S (para o SHELXL-97) Equação (10):

$$\text{Goof} = \left[\frac{\sum w \left(|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}^2 - |F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}^2 \right)^2}{(m-n)} \right]^{1/2} \quad \text{Eq. (10)}$$

Em que m corresponde ao número de observações, n, ao número de parâmetros independentes refinados. $\text{Goof} > 5$ indica algum problema com um dos conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}$ ou $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}$, e Goof, significativamente menor do que a unidade, não tem significado físico e a unidade é seu valor ideal²². Teoricamente, por ajustes no fator peso, w, pode se chegar a valores de S próximos da unidade. O grau de precisão do modelo cristalográfico construído e a estrutura real podem ser avaliados pelos índices de discordância (residual factors), calculado a partir do quantitativo total desviado entre os conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}$ e $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}$, dado pela Equação (11):

$$R = \frac{\sum \left| |F(\mathbf{h})|_{\text{obs}} - |F(\mathbf{h})|_{\text{cal}} \right|}{\sum |F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}} \quad \text{Eq. (11)}$$

Para uma estrutura confiável, o valor de R deve estar entre 0,02 e 0,06, após o refinamento. Elevados ao quadrado, todos os fatores de estrutura associados, os correspondentes às reflexões mais intensas têm um peso maior em relação aos correspondentes às reflexões fracas. Pode-se, então, com a Equação (12) avaliar alternativamente o refinamento,

$$R_w = \left[\frac{\sum w \left(|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}^2 - |F(\mathbf{h})|_{\text{cal}}^2 \right)^2}{\sum w \left(|F(\mathbf{h})|_{\text{obs}}^2 \right)^2} \right]^{1/2} \quad \text{Eq. (12)}$$

Os limites máximos para o valor de R, Equação (11), baseados na distribuição randômica de átomos dentro da cela unitária, são 0,83 e 0,59 para estruturas centrossimétricas e não-centrossimétricas, respectivamente. Valores aceitáveis para R, R_w e Goof indicam a convergência do refinamento e reforçam a confiança no modelo construído, mas não evidenciam de forma absoluta que os resultados obtidos estejam corretos.

O senso químico é um excelente indicador da qualidade estrutural, contudo, os dados estatísticos e cristalográficos devem ser prioritários na análise.

TESTES DE VALIDAÇÃO

Os testes de validação são frequentemente executados com o PLATON²³, um programa de amplo uso no trabalho cristalográfico que contém vários procedimentos computacionais e gráficos, para a análise dos resultados na determinação e/ou no refinamento da estrutura cristalina. Entre as várias ferramentas disponíveis²³, podem-se citar aquelas relacionadas com redução de dados, desenhos gráficos, validação e construção do arquivo CIF.

Finalizado o trabalho de construção do modelo estrutural, todas as informações cristalográficas podem ser armazenadas no arquivo CIF. Esse formato de arquivo armazena cada informação cristalográfica através de um código para o item no formato ASCII²¹.

Após toda a etapa de validação e análise de dados, o modelo cristalográfico no formato CIF pode ser depositado no banco de dados apropriado. Para pequenas



moléculas, geralmente, utiliza-se o CCDC, mantido pelo *Cambridge Crystallographic Data Centre*.

Aplicações Tecnológicas

Mediante a todo arcabouço de conhecimentos da metodologia cristalográfica, a sua aplicação, em determinadas áreas, é de suma importância, sobretudo, quando tratamos da elucidação estrutural de substâncias obtidas, tanto por vias de síntese, como isoladas de fontes naturais. Contudo, destacamos que este conhecimento sobre o arranjo tridimensional molecular, juntamente ao ordenamento periódico dos átomos ou moléculas, é extremamente útil para o entendimento das propriedades químicas, físico-químicas e biológicas dos compostos para os mais variados ramos da ciência⁶.

Na indústria farmacêutica, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos requer demanda de tempo na ordem de 10 anos, processos elaborados com alta propriedade intelectual, sistematizado e bastante rigoroso, além de envolver altos custos. Do início do projeto até a introdução de um fármaco no mercado farmacêutico, são investidos até 15 anos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), e estima-se que, em alguns casos, os gastos totais podem chegar a números de até US\$ 1 bilhão^{24,25}.

Atualmente, um dos grandes desafios de inovação das indústrias farmacêuticas está ligado à questão dos fármacos que apresentam polimorfismo, chamados de fármacos polimórficos. Estes sólidos são assim denominados, pois podem apresentar diferentes estruturas cristalinas para um determinado composto.

Determinar a estrutura cristalina de um composto ativo é uma das primeiras etapas do desenvolvimento de uma molécula com potencial interesse tecnológico, e o conhecimento de sua estrutura pode sugerir o quão facilmente ela pode ser formulada, ter aplicabilidade biológica e aludir sobre a sua durabilidade. Todavia, os compostos farmacêuticos podem existir em diferentes formas, apresentando diferentes arranjos estruturais, logo, diferentes propriedades físicas e químicas. Este fenômeno do polimorfismo, como já mencionado, é atualmente um grande problema na indústria farmacêutica, pois afeta diretamente a qualidade e eficácia de um fármaco, podendo resultar em ineficácia farmacêutica e também toxicidade. Por isso, o conhecimento dos diferentes

polimorfos de um cristal é essencial, antes dos estudos clínicos e dos testes de estabilidade, aludindo que a cristalografia de monocristais, por difração de raios X fornece tais informações estruturais que podem fazer a caracterização destes fármacos polimórficos²¹.

MINERALOGIA

No campo de estudo da ciência dos minerais – mineralogia, a utilização do método cristalográfico é de extrema notoriedade, uma vez que um mineral é um sólido de ocorrência natural com um arranjo atômico altamente ordenado e com composição química homogênea e definida. A determinação de sua estrutura cristalina fornece informações sobre posição atômica, tipo de ligações e a composição química dos blocos componentes básicos dos minerais. Informações essas fundamentais para os conceitos da cristalochimica que está relacionada com a composição química, estrutura interna e as propriedades físicas dos materiais cristalinos²⁶. O método da cristalografia de raios-X é utilizado para determinar a estrutura atômica dos minerais, desde 1920, sendo, assim, a mineralogia o ramo mais antigo da cristalografia. A utilização do método cristalográfico, para o estudo e entendimento dos minerais, remete a significativos avanços e informações que existem hoje sobre as rochas, formações geológicas e história da terra¹.

MACROMOLÉCULAS

As macromoléculas (moléculas com massa molecular elevada e formadas por um grande número de átomos de ordem superior a 1000 átomos) são uma das importantes classes de moléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e vírus. A cristalografia para macromoléculas é notória, sendo uma grande área de aplicação desta metodologia. A determinação da estrutura de uma macromolécula é de extremo estimo, numa era em que os proteomas ganham importância fundamental, a determinação da primeira estrutura atômica da matéria foi realizada por Bragg. No entanto, só após 45 anos, foi possível a resolução da primeira estrutura de proteínas por M. F. Perutz e J. C. Kendrew, tratava-se da estrutura da mioglobina, que rendeu aos autores o Prêmio Nobel de Química em 1962²⁷.

O principal caminho tecnológico utilizado para a resolução da estrutura cristalina de macromoléculas



biológicas tem sido a cristalografia por difração de raios X, sendo até hoje a principal metodologia para o entendimento da estrutura de macromoléculas biológicas^{28,29}. A abordagem moderna para o desenvolvimento de drogas fundamenta-se no princípio fármaco-receptor, que se dá através de mecanismos de complementaridade estérica, química e geométrica entre o ligante e a macromolécula alvo. Uma vez conhecida a estrutura de uma enzima como alvo patogênico, estas informações tornam-se valiosas na busca de possíveis inibidores³⁰.

Considerações Finais

A Assembleia Geral das Nações Unidas elegeu 2014 como o Ano Internacional da Cristalografia, em reconhecimento às contribuições desta área do conhecimento para a compreensão da natureza e suas aplicações. Ao fazer a declaração formal do ano internacional, várias ações, divulgando a importância e o impacto desta área, têm sido realizadas em todo o mundo. A Cristalografia é uma área da ciência que se dedica, por excelência, ao estudo dos cristais e ao entendimento da sua estrutura molecular, tanto dos cristais minerais (encontrados em abundância na natureza), quanto dos cristais de proteínas, obtidos sob condições controladas nos mais modernos laboratórios de bioquímica. Em um sentido amplo do termo, a Cristalografia pode ser vista como uma viagem ao interior dos cristais, com o objetivo de entender suas propriedades, de desbravar sua organização atômica e de inferir sobre suas características fundamentais.

A diversidade dos cristais encontrados na natureza é uma beleza à parte, tanto pela simetria interna, quanto pela forma externa. Nesse sentido, o trabalho cristalográfico é um misto de arte e ciência, uma vez que cada cristal exibe particularidades únicas de organização das suas moléculas, o que os tornam admiráveis. Essa organização singular exige um sólido conhecimento científico para descrever suas propriedades com segurança e qualidade, por meio das mais complexas metodologias experimentais.

Ao olharmos para a história da ciência, várias conquistas podem ser pontuadas por essa área do conhecimento: desde a simples estrutura do cloreto de sódio (sal de cozinha) até as complexas estruturas

de proteínas do organismo humano. Vários nomes da ciência como William Bragg, Linus Pauling, Herbert H. Hauptman, dentre outros, receberam o prêmio Nobel pela significativa contribuição à Cristalografia. Hoje, a relevância e o impacto dela podem ser observados no atual entendimento das ligações químicas e no fundamento moderno da obtenção de novos fármacos.

Outro aspecto da Cristalografia, a ser pontuado, refere-se à ampla aplicação tecnológica proporcionada pelo entendimento dos cristais. Seria inconcebível pensarmos a descoberta de novos fármacos, divorciando-a do entendimento de suas estruturas moleculares. Seria, também, impossível o entendimento atual das funções das proteínas se suas respectivas estruturas moleculares não fossem conhecidas. Haveria uma expressa lista de argumentos a favor do suporte dado pela pesquisa básica a pesquisa aplicada, que, como consequência, alicerça as ações de inovação. O estudo da história da ciência, em geral, e da história da Cristalografia, em particular, mostra isso. Os primeiros pesquisadores em Cristalografia atuavam, particularmente, na academia e, com o avançar da pesquisa aplicada e da inovação tecnológica, uma significativa parte deles passou a atuar nos setores produtivos, com destaque para a mineração e para a indústria farmacêutica.

Os processos educacionais, sobretudo, em nível de graduação, sempre enquadraram a Cristalografia como sub-área da Física, da Química e, mais recentemente, da Biologia Estrutural. Tal visão se justifica na própria essência, extensão e abrangência da Cristalografia. Contudo, não se pode perder de vista a independência dessa área das demais. Ela possui trajetória, pressupostos e fundamentos únicos.

Referências Bibliográficas

1. Schneegans, S. "Cristalografia e aplicações: no íntimo da matéria!". **2013**. <http://www.unesco.org>, acessado em 17/11/2014.
2. Schwarzenbach, D. *Crystallography*. John Wiley & Sons. Chichester, **1996**.
3. Glusker, J. P.; Lewis, M.; Rossi, M.; "Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists". Oxford: VCH, 2ª ed., **1994**.
4. Nobel prize. <http://www.iucr.org>, acessado em 19/11/2014.
5. Napolitano, H. B.; Camargo, A. J.; Mascarenhas, Y. P.; Vencato,



- I.; Lariucci, C. Análise da difração dos Raios X. Revista Processos Químicos, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 35-45, **2007**.
6. Fernandes, W. B.; Napolitano, H. B.; Pérez, C. N.; Martins, F. T.; Lariucci, C. Aplicações Tecnológicas da Metodologia Cristalográfica. Revista Processos Químicos, Goiânia, v. 4, n. 7, p. 19-32, **2010**.
 7. Giacovazzo, C.; Monaco, H. L.; Viterbo, D.; Scordari, F.; Gilli, G.; Zanotti, G.; Catti, M.; "Fundamentals of Crystallography". ed. Giacovazzo, Oxford: IUCR - Oxford University Press, 2ª ed., **2002**.
 8. Hammond, C.; "The Basics of Crystallography and Diffraction". Oxford: IUCr - Oxford University Press, 3ª ed., **2009**.
 9. Glusker, J. P.; Trueblood, K. N. "Crystal structure analysis: A primer." New York: IUCr - Oxford University Press, 3ª ed., 2010.
 10. Atkins, P.; Paula, J. Físico-Química. v.2, 8ª ed., Rio de Janeiro:LTC, **2008**.
 11. Clegg, W.; "Crystal Structure Analysis: Principle and Practices". New York: IUCr - Oxford University Press, 2ª ed., **2009**.
 12. Stout, G. H.; Jensen, L. H.; "X-Ray Structure Determination - A practical guide." New York: Wiley-Interscience, 2ª ed., **1989**.
 13. Shmueli, U.; "Theories and Techniques of Crystal Structure Determination". New York: IUCr - Oxford University Press, **2007**.
 14. Ladd, M.; Palmer, R. "Structure Determination by X-Ray Crystallography". Kluwer Academic", New York, 2ª ed., **2003**.
 15. Viterbo, D. "Em Fundamentals of crystallography". 2ª ed. New York: IUCr - Oxford University Press, 2ª ed., **2009**.
 16. Sheldrick, G. M.; "SHELXS-97 Program for the solution of crystal structures". Germany: University of Göttingen, **1990**.
 17. Altomare A. A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; "SIR92 - A program for crystal structure solution". J. Appl. Cryst., **1993**, v. 26, p. 343-350.
 18. Beurskens, P. T. et al. The DIRDIF-99 Program System. The Netherlands: Crystallography Laboratory, University of Nijmegen, **1999**.
 19. Sheldrick, G. M. "The SHELX-97 Tutorial". **1997**.
 20. Hall, S. R.; Allen, F. H.; Brown, I. D. "The Crystallographic Information File (CIF): a New Standard Archive File for Crystallography". Acta Cryst. A47, 655-685, **1991**.
 21. Napolitano, H. B.; Camargo, A. J.; Vencato, I.; Lariucci, C.; Ellena, J.; Cunha, S.; "Caracterização de Fármacos Polimórficos". Revista Estudos, v. 32, n. 11, p. 2021-2046, **2005**.
 22. Müller, P.; Irmer, R. H.; Spek, A. L.; Schneider, T. R.; Sawaya, M. R.; "Crystal Structure Refinement: A Crystallographer's Guide to SHELXL" New York: IUCr - Oxford University Press, **2006**.
 23. Spek, A. L.; "Platon / Pluton". Acta Cryst. A, 1990, v. 46.
 24. Guido, R.V. C.; Andricopulo, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. Revista Processos Químicos. Goiânia, v. 2, n. 4, p. 24-36, **2008**.
 25. Andricopulo, A. D.; Garratt, R. C.; Oliva, Glaucius. A importância da inovação no desenvolvimento da indústria farmacêutica. Revista Estudos, Goiânia - GO, v. 32, n. 11, p. 1877-1899, **2005**.
 26. Klein, C.; Dutrow, B.; Manual de ciências dos minerais; Trad. e Rev. Téc.: Rualdo Meneget - 23ª ed., Porto Alegre: Bookman, **2012**.
 27. Al Karadaghi, S. Introduction to Protein Crystallography: X-ray Diffraction and Data Collection. 2014. <http://www.proteinstructures.com/Experimental/Experimental/protein-crystallography.html>, acessado em 20/11/2014.
 28. Blundell, T. L.; Johnson, L. N. Protein Crystallography. Academic Press. USA. **1976**.
 29. Drenth, J. Principles of Proteins X-Ray Crystallography. Springer-Verlag. New York. USA. **1994**.
 30. Napolitano, H. B.; Estudos estruturais da enzima Fosforribosilpirofosfato sintase de Cana-de-açúcar. Tese (Doutorado - Área de Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2004**.

Leonardo R. Almeida^{1*},
Jhonata J. Silva¹, Vitor S.
Duarte¹, Thalita N. S. dos
Santos¹ & Hamilton B.
Napolitano^{1,2}

¹Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG. Caixa Postal 459, CEP 75001-970, Anápolis, GO, Brasil.

²Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, CEP 75113-630, Anápolis, GO, Brasil.

*E-mail: leonardochem@hotmail.com